



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104783899 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510157508. 7

(22) 申请日 2015. 04. 03

(71) 申请人 天津中医药大学第二附属医院

地址 300150 天津市河北区真理道 816 号

(72) 发明人 封继宏 孙增涛 郑兆晔 魏葆琳

李美凤 祁海燕 苏景深 关鹏

刘伟 郭思佳 刘二伟

(74) 专利代理机构 四川君士达律师事务所

51216

代理人 苟忠义

(51) Int. Cl.

A61B 19/00(2006. 01)

A61D 7/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法,取菌株 ATCC25922 接种于血琼脂培养皿,37℃培养 18-24h,挑取单菌落接种 THB 液体培养基,37℃,200rpm/min 振荡培养 12h,离心浓缩后,据预实验结果,用无菌 PBS 制备 $1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细菌悬液,4℃保存,2h 之内用于接种实验动物。



1. 一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤 1、菌株与细菌培养

大肠埃希菌标准菌株由天津市临床检验中心提供,菌株号:ATCC25922,取菌株 ATCC25922 接种于血琼脂培养皿,37℃培养 18-24h,挑取单菌落接种 THB 液体培养基,37℃,200rpm/min 振荡培养 12h,离心浓缩后,据预实验结果,用无菌 PBS 制备 $1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细菌悬液,4℃保存,2h 之内用于接种实验动物;

步骤 2、实验动物

清洁级 Wistar 雄性大鼠 60 只,月龄 3-6 个月,体重 180 ± 20g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格许可证号:SCXK(京)2009-0004;实验大鼠喂养在天津实验动物中心,饲养环境室内相对湿度为 50% -60%,温度控制在 18-22℃;常规饲料喂养,自由饮用水,按时通风冲刷粪便,保持环境安静,适应性喂养 1 周后开始实验;

步骤 3 接种细菌

采用内窥镜引导下气管内灌注的滴注菌液方式,设备采用鼻 0 度 4# 硬式内窥镜、氙灯冷光源及松下 KS-822 摄录监视系统;

将大鼠置于直径为 26cm 的干燥器内乙醚麻醉,麻醉满意后迅速将鼠从麻醉器中取出,呈仰卧位状以弹力固定夹将其四肢分别固定于鼠板上;

两名操作者并排位于鼠头顶方向,首先助手以左手持鼠麻醉喉镜,自鼠上唇齿伸入口腔、提压鼠舌,伸至鼠会厌缘处时提拉鼠舌根,以右手持牵拉套圈,套住鼠上列长尖牙门齿,左右手同时相反方向上下牵拉舌根与长尖牙门齿,使鼠自唇齿至喉部间上呼吸畅通暴露声门区域,此时主操作者以左手持 0 度硬式内窥镜,右手持 7 号长针注射器,内装定量造模所用肺炎链球菌菌悬液,在监视器显示引导下将 7 号长注射针插入气管内,并深入声门下 15 ~ 20mm,此时观察鼠的声带活动情况,当双侧声带由内收状向外展状变化时,迅速推注 2ml 大肠埃希菌菌液,随后注入 100 μl 空气,此时鼠呈吸气阶段,使药物随吸气时的气流充分进入支气管内,推注完毕后,将鼠板迅速立起鼠头在上左右翻转 8 ~ 10 秒,空白组不做处理,盐水对照组注入同等量的无菌生理盐水;

解除鼠四肢弹力固定夹将鼠放回鼠笼内待复苏,鼠复苏时间为 30 ~ 60 秒,然后置于恒温动物房饲养;接种后每日观察其活动、取食、精神的一般情况,记录相应数据。

2. 根据权利要求 1 所述的无创制作细菌性肺炎动物模型的方法,其特征在于,所述大肠埃希菌菌液的浓度为 $1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法

技术领域

[0001] 本发明属于动物实验模型构建技术领域,具体地说,涉及一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法。

背景技术

[0002] 现有的细菌性肺炎动物模型的构建方法有很多,主要包括:经鼻滴入法、经口咽气管滴入法、雾化吸入法、气管插管法、直视下给药法等方法。虽然方法很多,但是构建出的动物模型的质量参差不齐。众多方法均能不同程度模拟临床构建细菌性肺炎动物模型,但是均存在一定弊端,导致诸多动物模型不稳定。

[0003] 经鼻滴入法最符合临床患者的感染方式,但是实验研究中发现该方法大多动物不能成模型,滴鼻之后,动物吸入的量无法控制在同一水平,而且不能保证其吸入程度,故构建出的模型质量比较低。经口咽气管滴入法、雾化吸入法的缺点同上。

[0004] 气管切开法:为有创操作,简单易行,且在切开后,视野暴露良好,易于准确定位;但术后感染与否以及操作对于气管局部以及周围组织的破坏难以掌握,存活率和局部感染易对某些感染类指标产生影响。

[0005] 直视下给药法:选取光源暴露声门后,操作者在直视声门的情况下,进行气管内给药的相关操作,较其他方法创伤小,器械和技术水平要求相应也降低,但选择合适的光源清晰暴露声门则是此法关键环节,多选用灯泡,冷光源,手电等透过颈部的光线。此时辅以牵拉舌根暴露声门,但大鼠头部狭长,声门狭小并且在口腔深部,选用的给药装置如过粗或形态不能很好配合生理曲度时,在逐渐接近会厌部,则会挡住大部分视线,在声门暴露的短暂时间内,较难准确插入声门完成操作,并容易将给药装置误入食管或因为视野不清反复多次插入造成喉头水肿,气道损伤,声带出血,严重时甚至大鼠死亡。

[0006] 盲插法:经口气管内给药,在没有暴露声门的情况下,容易反复刺激喉部,造成粘膜水肿出血,气道分泌物增加,导致气道阻塞,另外极易将注射装置误入食道,成功率较低。经皮气管内给药,则需要从外部皮肤直接准确定位气管位置并从环状软骨间隙给药,对操作人的技术要求较高,否则容易多次刺激局部肌肉及筋膜等,给药效果难以评估,还容易造成水肿出血,成功率低。

[0007] 吸入法:一般情况下,除满足药物雾化后粒径要求外,选择合适的雾化发生装置和动物雾化吸入装置同样重要,药液用量小常用压缩式雾化器,若用量大则用超声雾化器;而吸入装置应根据不同动物选择不同型号的面罩或喷雾吸嘴。目前常用的是动式吸入装置,应选择对供试品吸附较少,气溶胶发生能力强、密封性好、易于清洗的装置,并确保能快速达到试验所需浓度并在试验过程中保持药物浓度稳定性。药物仍须保持分散均匀,不形成结块。所以从雾化粒径之外,装置要求较多,并难以计算以及掌握吸入量的多少,容易造成给药量不均。

[0008] 针对上述现有的操作技术,目前,需要一种操作方便,成功率高,损伤小且成本低廉的大鼠用气管内给药方法。

发明内容

[0009] 为了克服现有技术中存在的缺陷,本发明提出了一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法,通过气管内滴注大肠埃希菌模拟临床建立肺炎动物模型,探究扶正解毒中药对肺炎动物炎症调控机制。其技术方案如下:

[0010] 一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法,包括以下步骤:

[0011] 步骤 1、菌株与细菌培养

[0012] 大肠埃希菌标准菌株由天津市临床检验中心提供,菌株号:ATCC25922,取菌株 ATCC25922 接种于血琼脂培养皿,37℃培养 18-24h,挑取单菌落接种 THB 液体培养基,37℃,200rpm/min 振荡培养 12h,离心浓缩后,据预实验结果,用无菌 PBS 制备 $1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细菌悬液,4℃保存,2h 之内用于接种实验动物;

[0013] 步骤 2、实验动物

[0014] 清洁级 Wistar 雄性大鼠 60 只,月龄 3-6 个月,体重 180 ± 20g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格(许可)证号:SCXK(京)2009-0004;实验大鼠喂养在天津实验动物中心,饲养环境室内相对湿度为 50% -60%,温度控制在 18-22℃;常规饲料喂养,自由饮用水,按时通风冲刷粪便,保持环境安静,适应性喂养 1 周后开始实验;

[0015] 步骤 3 接种细菌

[0016] 采用内窥镜引导下气管内灌注的滴注菌液方式,设备采用鼻 0 度 4# 硬式内窥镜、氙灯冷光源及松下 KS-822 摄录监视系统;

[0017] 将大鼠置于直径为 26cm 的干燥器内乙醚麻醉,麻醉满意后迅速将鼠从麻醉器中取出,呈仰卧位状以弹力固定夹将其四肢分别固定于鼠板上;

[0018] 两名操作者并排位于鼠头顶方向,首先助手以左手持鼠麻醉喉镜,自鼠上唇齿伸入口腔、提压鼠舌,伸至鼠会厌缘处时提拉鼠舌根,以右手持牵拉套圈,套住鼠上列长尖牙门齿,左右手同时相反方向上下牵拉舌根与长尖牙门齿,使鼠自唇齿至喉部间上呼吸畅通暴露声门区域,此时主操作者以左手持 0 度硬式内窥镜,右手持 7 号长针注射器,内装定量造模所用肺炎链球菌菌悬液,在监视器显示引导下将 7 号长注射针插入气管内,并深入声门下 15 ~ 20mm,此时观察鼠的声带活动情况,当双侧声带由内收状向外展状变化时,迅速推注 2ml 大肠埃希菌菌液,随后注入 100 μl 空气,此时鼠呈吸气阶段,使药物随吸气时的气流充分进入支气管内,推注完毕后,将鼠板迅速立起鼠头在上左右翻转 8 ~ 10 秒,空白组不做处理,盐水对照组注入同等量的无菌生理盐水;

[0019] 解除鼠四肢弹力固定夹将鼠放回鼠笼内待复苏,鼠复苏时间约 30 ~ 60 秒,然后置于恒温动物房饲养;接种后每日观察其活动、取食、精神的一般情况,记录相应数据。

[0020] 进一步优选,所述大肠埃希菌菌液的浓度为 $1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0021] 本发明的有益效果为:

[0022] 本发明造模过程更加严谨、减小损伤,提高了模型质量,能够使药物完全进入动物气管内从而进入肺内,内造成肺部感染,易于模型成功建立;同时避免了其他造模方法的操作过程中对动物的局部造成创伤和感染,对造模的评估造成干扰;造模动物死亡数量下降,降低了经济成本。

附图说明

[0023] 图 1 为模型组的肺组织大体标本图,

[0024] 图 2 为空白组的肺组织大体标本图。

具体实施方式

[0025] 下面结合附图和具体实施方式对本发明的技术方案作进一步详细地说明。

[0026] 1 材料与方法

[0027] 1.1 菌株与细菌培养

[0028] 大肠埃希菌标准菌株由天津市临床检验中心提供,菌株号:ATCC25922。取菌株 ATCC25922 接种于血琼脂培养皿,37℃培养 18-24h,挑取单菌落接种 THB 液体培养基,37℃,200rpm/min 振荡培养 12h,离心浓缩后,据预实验结果,用无菌 PBS 制备 $1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细菌悬液,4℃保存,2h 之内用于接种实验动物。

[0029] 1.2 实验动物

[0030] 清洁级 Wistar 雄性大鼠 60 只,月龄 3-6 个月,体重 $180 \pm 20\text{g}$,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物合格(许可)证号:SCXK(京)2009-0004。实验大鼠喂养在天津实验动物中心,饲养环境室内相对湿度为 50%-60%,温度控制在 18-22℃。常规饲料喂养,自由饮用水,按时通风冲刷粪便,保持环境安静。适应性喂养 1 周后开始实验。

[0031] 2 接种细菌

[0032] 采用课题组自创的内窥镜引导下气管内灌注的滴注菌液方式。设备采用鼻 0 度 4# 硬式内窥镜、氙灯冷光源及松下 KS-822 摄录监视系统。

[0033] 将大鼠置于直径为 26cm 的干燥器内乙醚麻醉,麻醉满意后迅速将鼠从麻醉器中取出,呈仰卧位状以弹力固定夹将其四肢分别固定于鼠板上。

[0034] 两名操作者并排位于鼠头顶方向,首先助手以左手持鼠麻醉喉镜,自鼠上唇齿伸入口腔、提压鼠舌,伸至鼠会厌缘处时提拉鼠舌根,以右手持牵拉套圈,套住鼠上列长尖牙门齿,左右手同时相反方向上下牵拉(适度)舌根与长尖牙门齿,使鼠自唇齿至喉部间上呼吸畅通暴露声门区域,此时主操作者以左手持 0 度硬式内窥镜,右手持 7 号长针注射器(内装定量造模所用肺炎链球菌菌悬液),在监视器显示引导下将 7 号长注射针插入气管内,并深入声门下约 15 ~ 20mm,此时观察鼠的声带活动情况,当双侧声带由内收状向外展状变化时,迅速推注 2ml 大肠埃希菌菌液($1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 随后注入 100 μl 空气,因为此时鼠呈吸气阶段,可以使药物随吸气时的气流充分进入支气管内,取得最佳的造模效果。推注完毕后,将鼠板迅速立起鼠头在上左右翻转数次约 8 ~ 10 秒,此目的是利用体位及重力作用,使药物充分能够达到细支气管以提高造模药物肺部覆盖面。空白组不做处理,盐水对照组注入同等量的无菌生理盐水。

[0035] 解除鼠四肢弹力固定夹,将鼠放回鼠笼内待复苏。鼠复苏时间约 30 ~ 60 秒。然后置于恒温动物房饲养。接种后每日观察其活动、取食、精神等一般情况,记录体重(g)等相应数据。

[0036] 1. 动物一般情况

[0037] 动物接种第 1 天,死亡 2 只,因麻醉过度造成,与造模方法无关,随后即完成补充,各造模组在造模后的第 1 天均出现烦躁,第 2、3 天动物进食、活动强度明显下降,毛发直竖,

蜷缩于饲养笼角落,鼻腔开始出现分泌物,少部分大鼠有轻微喘息。模型组后死亡 2 只。从第 4 天起,动物食欲、活动度进一步下降,其余症状亦有加重趋势,第 5、6 天动物病情较前加重,有部分大鼠第 7 天时发现病情较前减轻。

[0038] 盐水注射对照组大鼠进食无明显烦躁,但活动度亦有轻微增加,进食、体重等情况尚可,空白组大鼠进食、活动度、体重、体温较接种前无明显变化。

[0039] 2. 肺组织病理改变:

[0040] 2.1 肺组织大体标本观察:

[0041] 细菌接种后 24 小时处死动物,开胸取全肺组织观察。空白对照组、生理盐水对照组小鼠肺组织颜色红润,无充血水肿现象,呈淡粉色、纹理清晰、质地柔软,弹性良好。模型组大鼠肺组织表现为严重的组织水肿及充血,呈深红色,质地变硬,弹性较差。具体如图 1- 图 2 所示。

[0042] 2.2 肺组织切片病理学观察:

[0043] 空白组和盐水注射对照组:支气管及肺泡均正常,可见气管周围轻度的炎细胞浸润;

[0044] 模型组:可见支气管周围、肺泡腔内炎性渗出明显,肺泡间隔增宽,大量炎性细胞浸润,毛细血管扩张、充血、出血,血管壁增厚。

[0045] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,本发明的保护范围不限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,可显而易见地得到的技术方案的简单变化或等效替换均落入本发明的保护范围内。



图 1



图 2

专利名称(译)	一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法		
公开(公告)号	CN104783899A	公开(公告)日	2015-07-22
申请号	CN201510157508.7	申请日	2015-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	天津中医药大学第二附属医院		
申请(专利权)人(译)	天津中医药大学第二附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	天津中医药大学第二附属医院		
[标]发明人	封继宏 孙增涛 郑兆晔 魏葆琳 李美凤 祁海燕 苏景深 关鹏 刘伟 郭思佳 刘二伟		
发明人	封继宏 孙增涛 郑兆晔 魏葆琳 李美凤 祁海燕 苏景深 关鹏 刘伟 郭思佳 刘二伟		
IPC分类号	A61B19/00 A61D7/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种无创制作细菌性肺炎动物模型的方法，取菌株 ATCC25922 接种于血琼脂培养皿，37℃ 培养 18-24h，挑取单菌落接种 THB 液体培养基，37℃，200rpm/min 振荡培养 12h，离心浓缩后，据预实验结果，用无菌 PBS 制备 $1.2 \times 10^9 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 细菌悬液，4℃ 保存，2h 之内用于接种实验动物。

